



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/56810</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Dezember 1998 (17.12.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03460</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juni 1998 (09.06.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 24 301.0 9. Juni 1997 (09.06.97) DE 197 49 073.5 6. November 1997 (06.11.97) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINE, Gabriele [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). NEHLS, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). MEYER, Markus, [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). BEN- SCH, Klaus [DE/DE]; Grillenweg 11, D-78315 Radolfzell (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	

(54) Title: LUS-I HUMAN PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE

(54) Bezeichnung: HUMANES PROTEIN LUS-I, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

This invention relates to protein having the following amino acid sequence, in accordance with ID Sequence ID N° 1: NH₂-Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr- Cys-Lys-Glu-Pro-Met- Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg- Thr-Ile-Thr-Arg- Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr- Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu- Val-Thr-Val-Glu- Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe- Asn-Gln-Ser-Pro- Val-Val-Thr-Arg- Ser-Cys-Ser-Ser- Ser-Cys-Val-Ala-Thr- Asp-Pro-Asp-Ser- Ile-Gly-Ala-Ala- His-Leu-Ile-Phe- Cys-Cys-Phe-Arg- Asp-Leu-Cys-Asn- Ser-Glu-Leu-COOH (LUS-I). It also relates to its cyclic, glycosylated, phosphorylated, acetylated, amidated derivatives, and/or its derivatives containing cross-linkages of side chains, as well as fragments having the biological activity of LUS-I.

(57) Zusammenfassung

Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß der Sequenz ID No. 1: NH₂-Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr-Cys-Lys-Glu-Pro-Met-Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg-Thr-Ile-Thr-Arg-Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr-Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Glu-Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe-Asn-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Asp-Ser-Ile-Gly-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Phe-Cys-Cys-Phe-Arg-Asp-Leu-Cys-Asn-Ser-Glu-Leu-COOH (LUS-I), und seine cyclischen, glykosylierten, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder Verknüpfungen von Seitenketten enthaltenden Derivate sowie Fragmente mit der biologischen Aktivität von LUS-I.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Humanes Protein LUS-I, seine Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide und Peptidderivate mit biologischer Aktivität.

Ridge und Sloane publizierten ein anti-neoplastisches Urinpeptid (R.J. Ridge & N.H. Sloane, Cytokine 8 (1996), 1-5) mit einer dort angegebenen Struktur und einem Molekulargewicht in der Größenordnung von 16 kDa. Dieses Protein ist auch Gegenstand der US-PS 5,298,604.

Erfindungsgemäß wurde ein Protein mit der Aminosäuresequenz der Formel

NH₂-Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr-Cys-Lys-Glu-Pro-Met-Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg-Thr-Ile-Thr-Arg-Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr-Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Glu-Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe-Asn-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Asp-Ser-Ile-Gly-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Phe-Cys-Cys-Phe-Arg-Asp-Leu-Cys-Asn-Ser-Glu-Leu-COOH (LUS-I) gefunden.

Auch die cyclischen, glykosylierten, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder Verknüpfungen von Seitenketten enthaltenden Derivate sowie Fragmente mit der biologischen Aktivität von LUS-I sind Gegenstand der Erfindung.

Entsprechende Derivate sind durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren, insbesondere durch Synthese der Peptide an festen Phasen nach Merryfield erhältlich. Alternativ hierzu kann auch das erhaltene Peptid chemisch modifiziert werden. Entsprechende Derivate können stabiler gegenüber einer Proteolyse sein und/oder veränderter Halbwertszeiten in einem Organismus aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform bildet das Cystein in Sequenzposition 3 mit dem Cystein in Position 28, das Cystein in Position 6 mit dem Cystein in Position 15, das Cystein in Position 21 mit dem Cystein in Position 51 oder 55, das Cystein in Position 77 mit dem Cystein in Position 71 oder 72 und/oder das Cystein in Position 51 oder 55 mit dem Cystein in Position 71 oder 72 eine intramolekulare Disulfidbrücke. Dieses Disulfidmuster wurde mittels proteolytischer Spaltung mit verschiedenen Endoproteasen und Sequenzierung der erhaltenen Bruchstücke erhalten. Die entsprechenden Fragmente wurden durch Kombination von Elektrospray-Massenspektroskopie und Proteinsequenzierung nach Edman sequenziert. Sowohl aus menschlichem Hämofiltrat als auch aus Urin gewonnenes LUS-I wiesen identische chromatographische Eigenschaften, Molekulargewichte und Disulfidmuster auf.

Das erfindungsgemäße Protein läßt sich aus humanem Blutfiltrat oder Urin mittels chromatographischer Methoden in reiner Form isolieren oder durch Festphasenpeptidsynthese oder rekombinante Expression in Mikroorganismen herstellen.

Die Bestimmung des relativen Molekulargewichts durch Elektrospray-Massenspektrometrie von isoliertem LUS-I aus menschlichem Blutfiltrat ergab 8845 Da und stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht der bestimmten Aminosäuresequenz von 8843 Da überein. Die bevorzugte Struktur des Peptides LUS-I besteht darin, daß alle in seiner Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteinreste Bestandteile von Disulfidbrücken sind.

Disulfidbrücken bilden sich im Rahmen der Faltung des Peptides im allgemeinen eigenständig. Die Faltung eines durch chemische Synthese oder rekombinante Expression erhaltenen Peptides kann durch geeignete Agenzien unterstützt werden. Entsprechende Techniken sind dem Fachmann für die Aufarbeitung von sogenannten "inclusion bodies" aus Bakterien bekannt.

Das erfindungsgemäße Protein LUS-I wird in einer nicht membran-gebundenen Form aus seinen Ursprungsgeweben in das Blut sezerniert.

niert. Wie molekularbiologische Befunde ergeben, wird das erfindungsgemäße Protein insbesondere in Tonsillen, der Mundschleimhaut, Augenschleimhäuten, Vaginalepithel, Urethra, Magenschleimhaut, Nebenniere und Niere exprimiert.

Das erfindungsgemäße Protein eignet sich insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von bakteriellen und viralen Effekten, der Über- oder Unterexpression von LUS-I, von Krebserkrankungen, wie Krebserkrankungen des Gebärmutterhalses, das kleinzellige Bronchialkarzinom, Pankreaskarzinom, Mammakarzinom und Melanome sowie von Autoimmunerkrankungen, angioneurotischem Ödem, Asthma bronchiale und paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellen Arzneimittel dar, die die erfindungsgemäßen Peptide in einer pharmazeutisch üblichen Darreichungsform enthalten.

Mögliche pharmazeutische Darreichungsformen sind insbesondere solche, die dem Fachmann bekannt sind für die intravenöse, intraarterielle, intramuskuläre, orale, nasale oder transpulmonare Applikation. Dabei sind insbesondere solche Darreichungsformen bevorzugt, die einen Abbau der erfindungsgemäßen Peptide durch Proteolyse nach der Verabreichung verhindern oder verzögern. Für eine orale Applikation wird es daher bevorzugt, eine Darreichungsform zu wählen, die die Einwirkung von Verdauungsenzymen auf die erfindungsgemäße Peptide vermeidet. Die zur Herstellung dieser Darreichungsformen zu verwendenden Hilfsstoffe sind dem Fachmann bekannt. Es sind insbesondere solche Hilfsstoffe bevorzugt, die keine toxischen Wirkungen aufweisen.

Die bevorzugte, zu verabreichende Menge der erfindungsgemäßen Peptide liegt zwischen 1 µg und 1 g pro Dosiseinheit bei einer Verabreichung von 1 bis 5 Dosen des Arzneimittels pro Tag.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, Antisen-

senukleotide, die unter stringenten Bedingungen an Nukleinsäuresequenzen binden, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, Antikörper, die an die erfindungsgemäßen Peptide binden, Inhibitoren, die die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Peptide hemmen und Inhibitoren, die die Expression von LUS-I hemmen sowie transgene Säugetiere mit Gendefizienz für LUS-I, die sich insbesondere zur Tumorforschung eignen, zur Untersuchung des Einflusses von LUS-I auf die Bildung und Entwicklung von Tumoren.

Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, kann der Fachmann unter Anwendung des genetischen Codes aus der Sequenz der erfindungsgemäßen Peptide ableiten. Für eine Expression in rekombinanten Organismen werden insbesondere solche Codons gewählt, die dem Codon Usage des transformierten Organismus entsprechen. Antisensenukleotide, d.h. Nucleotide, die unter stringenten Bedingungen an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen binden, weisen insbesondere solche Sequenzen auf, die mit Teilen der mRNA im Zielsystem eine Bindung eingehen können. Aus der Peptidsequenz kann der Fachmann mit bekannten Methoden die Sequenz der mRNA ermitteln. Beispielsweise können hierzu aus geringvarianten Bereichen Primergemische abgeleitet werden, mit denen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodierende mRNA (nach Umschreibung in cDNA mittels reverser Transkriptase), amplifiziert werden können. Mit bekannten Methoden der DNA-Sequenzierung kann so die Sequenz der mRNA bestimmt werden.

In bevorzugten Ausführungsformen weisen die Antisensenukleotide Modifikationen auf, die den Abbau der Nukleotide durch endogene Substanzen, insbesondere Nukleasen verzögern. Solche Modifikationen sind dem Fachmann bekannt, insbesondere durch Modifikation der Phosphatbindungen wie beispielsweise Thiophosphate, Methylphosphate, H-Phosphonate, Phosphotriester usw.

Antikörper, die an die erfindungsgemäßen Peptide binden, können in einfacher Weise durch Immunisierung von Tieren erhalten

werden. Dazu werden die Peptide gegebenenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen in mehrwöchigem Abstand den Tieren injiziert und anschließend Antikörpern aus dem Blut isoliert. Bevorzugte Tiere sind hierfür Kaninchen und Mäuse. Durch bekannte Verfahren können aus den antikörperproduzierenden Mäusezellen immortale Zellen erhalten werden, die die Produktion von monoklonalen Antikörper erlauben.

Inhibitoren, die die biologische Aktivität der Peptide hemmen, sind insbesondere solche, die nicht-kovalent oder kovalent an das Enzym binden. Dies können Antikörper sein oder auch niedermolekulare Moleküle. Inhibitoren, die die Expression von LUS-1 hemmen, sind Substanzen, die die Transkription oder Translation des Genes hemmen. Dies können beispielsweise Antisensenukleotide sein.

Die erfindungsgemäßen transgenen Säugetiere mit Gendeffizienz LUS-1 werden nach dem Fachmann bekannten Methoden erhalten. Dabei wird im allgemeinen die homologe Rekombination zwischen DNA-Sequenzen ausgenutzt. Die dazu notwendigen Vektoren lassen sich bei Kenntnis der Gensequenz in einfacher Weise konstruieren. Bei Kenntnis der mRNA-Sequenz kann beispielsweise - ebenfalls durch Polymerasekettenreaktion - das Gen aufgefunden werden und das amplifizierte Genfragment mittels Sequenzierung aufgeklärt werden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich auch zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von somatischen und nicht somatischen Generkrankungen, indem die fehlende oder nicht korrekte Expression des LUS-1 korrigiert wird.

Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen Proteine, Nukleinsäuren und Antisensenukleotide, Antikörper und Inhibitoren zur Herstellung von Diagnostikmitteln. Insbesondere die Antikörper ermöglichen dabei eine Bestimmung der Expression des erfindungsgemäßen Proteins in Gewebe- oder Körperflüssigkeiten, beispielsweise mittels eines Immunoassays wie des bekannten ELISA.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kann - durch Amplifikationsreaktionen wie Polymerasekettenreaktionen - analysiert werden, ob Generkrankungen vorliegen, die dann mit Hilfe der erfindungsgemäßen Arzneimittel behandelt werden können.

- 7 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humanes Protein LUS-I, seine
Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Leu	Lys	Cys	Tyr	Thr	Cys	Lys	Glu	Pro	Met	Thr	Ser	Ala	Ser	Cys	Arg
1				5				10					15		
Thr	Ile	Thr	Arg	Cys	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Cys	Met	Thr	Thr	Leu
			20					25					30		
Val	Thr	Val	Glu	Ala	Glu	Tyr	Pro	Phe	Asn	Gln	Ser	Pro	Val	Val	Thr
			35					40					45		

A n s p r ü c h e

1. Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß der Sequenz ID No. 1

NH₂-Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr-Cys-Lys-Glu-Pro-Met-Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg-Thr-Ile-Thr-Arg-Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr-Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Glu-Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe-Asn-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Asp-Ser-Ile-Gly-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Phe-Cys-Cys-Phe-Arg-Asp-Leu-Cys-Asn-Ser-Glu-Leu-COOH
(LUS-I)

und seine cyclischen, glykosylierten, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder Verknüpfungen von Seitenketten enthaltenden Derivate sowie Fragmente mit der biologischen Aktivität von LUS-I.

2. Verfahren zur Herstellung des Proteins gemäß Anspruch 1 durch Aufreinigung aus humanem Blutfiltrat oder Urin, durch Festphasenpeptidsynthese oder rekombinante Expression in Mikroorganismen, gegebenenfalls modifiziert durch chemische oder biochemische Methoden.
3. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für das Protein gemäß Anspruch 1 kodiert.
4. Antisensenukleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es unter stringenten Bedingungen an eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 bindet.
5. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er an ein Protein gemäß Anspruch 1 bindet.
6. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die biologische Aktivität des Proteins gemäß Anspruch 1 hemmt.

7. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die Expression von LUS-I hemmt.
8. Verwendung des Proteins gemäß Anspruch 1, Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3, Antisensenukleotide gemäß Anspruch 4, Antikörper gemäß Anspruch 5, Inhibitoren gemäß Anspruch 6 und/oder 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von bakteriellen und viralen Effekten, der Über- oder Unterexpression von LUS-I, von Krebserkrankungen, wie Krebserkrankungen des Gebärmutterhalses, das kleinzellige Bronchialkarzinom, Pankreaskarzinom, Mammakarzinom und Melanome sowie von Autoimmunerkrankungen, angioneurotischem Ödem, Asthma bronchiale und paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie.
9. Arzneimittel enthaltend das Protein gemäß Anspruch 1, Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3, Antisensenukleotide gemäß Anspruch 4, Antikörper gemäß Anspruch 5, Inhibitoren gemäß Anspruch 6 und/oder 7.
10. Verwendung der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung somatischer oder nicht-somatischer Generkrankung.
11. Transgenes Säugetier mit Gendefizienz für LUS-I.
12. Diagnostikmittel enthaltend des Protein gemäß Anspruch 1, eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3, ein Antisensenukleotid gemäß Anspruch 4, einen Antikörper gemäß Anspruch 5, einen Inhibitor gemäß Anspruch 6 und/oder 7.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/11, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/16, A01K 67/027	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/56810 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Dezember 1998 (17.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03460 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juni 1998 (09.06.98) (30) Prioritätsdaten: 197 24 301.0 9. Juni 1997 (09.06.97) DE 197 49 073.5 6. November 1997 (06.11.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINE, Gabriele [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). NEHLS, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). MEYER, Markus, [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). BEN-SCH, Klaus [DE/DE]; Grillenweg 11, D-78315 Radolfzell (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 11. März 1999 (11.03.99)	
(54) Title: LUS-1 HUMAN PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE (54) Bezeichnung: HUMANES PROTEIN LUS-I, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract This invention relates to protein having the following amino acid sequence, in accordance with ID Sequence ID N° 1: NH ₂ -Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr- Cys-Lys-Glu-Pro-Met- Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg- Thr-Ile-Thr-Arg- Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr-Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu- Val-Thr-Val-Glu- Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe- Asn-Gln-Ser-Pro- Val-Val-Thr-Arg- Ser-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Val-Ala-Thr- Asp-Pro-Asp-Ser- Ile-Gly-Ala-Ala- His-Leu-Ile-Phe- Cys-Cys-Phe-Arg- Asp-Leu-Cys-Asn-Ser-Glu-Leu-COOH (LUS-I). It also relates to its cyclic, glycosylated, phosphorylated, acetylated, amidated derivatives, and/or its derivatives containing cross-linkages of side chains, as well as fragments having the biological activity of LUS-I. (57) Zusammenfassung Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß der Sequenz ID No. 1: NH ₂ -Leu-Lys-Cys-Tyr-Thr-Cys-Lys-Glu-Pro-Met-Thr-Ser-Ala-Ser-Cys-Arg-Thr-Ile-Thr-Arg-Cys-Lys-Pro-Glu-Asp-Thr-Ala-Cys-Met-Thr-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Glu-Ala-Glu-Tyr-Pro-Phe-Asn-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Val-Ala-Thr-Asp-Pro-Asp-Ser-Ile-Gly-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Phe-Cys-Cys-Phe-Arg-Asp-Leu-Cys-Asn-Ser-Glu-Leu-COOH (LUS-I), und seine cyclischen, glykosylierten, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder Verknüpfungen von Seitenketten enthaltenden Derivate sowie Fragmente mit der biologischen Aktivität von LUS-I.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ National Application No
PCT/EP 98/03460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/16
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 14959 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;SIRNA ANTONINO (IT)) 7 July 1994 see the whole document ---	1-12
X	US 5 298 604 A (SLOANE NATHAN H) 29 March 1994 cited in the application see the whole document ---	1-12
X	MASTRANGELI R.: "H. sapiens ARS gene, component B, ARS" EMBL DATABASE, 11 September 1996, XP002087799 HEIDELBERG, DE Accession Number: X99977 ---	1-5, 11, 12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 December 1998

Date of mailing of the international search report

12/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 98/03460

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SLOANE N.H. ET AL.: "Studies on an antineoplastic fraction from human urine characterization of the major protein in this fraction"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 234, no. 2, 1986, pages 355-362, XP002087807 see the whole document</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/03460

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 6, 7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Remark: Claims 6 and 7 were not searched because their subject matter was not fully disclosed (Art. 6, PCT)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/03460

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9414959 A	07-07-1994	IT 1257184 B AU 690093 B AU 5833594 A CA 2151156 A EP 0675956 A FI 953091 A JP 8509359 T NO 952494 A ZA 9309621 A	10-01-1996 23-04-1998 19-07-1994 07-07-1994 11-10-1995 21-06-1995 08-10-1996 21-08-1995 22-06-1995
US 5298604 A	29-03-1994	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In additionales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03460

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/16 A01K67/027		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 14959 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ; SIRNA ANTONINO (IT)) 7. Juli 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	US 5 298 604 A (SLOANE NATHAN H) 29. März 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	MASTRANGELI R.: "H. sapiens ARS gene, component B, ARS" EMBL DATABASE, 11. September 1996, XP002087799 HEIDELBERG, DE Accession Number: X99977 ---	1-5, 11, 12
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 23. Dezember 1998		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 12/01/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Panzica, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03460

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>SLOANE N.H. ET AL.: "Studies on an antineoplastic fraction from human urine characterization of the major protein in this fraction"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 234, Nr. 2, 1986, Seiten 355-362, XP002087807 siehe das ganze Dokument -----</p>	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 03460

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 6, 7
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 Bemerkung: Ansprüche 6 und 7 wurden nicht recherchiert weil deren Gegenstand nicht vollständig offenbart wurde (Art 6, PCT)

3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefördert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03460

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9414959 A	07-07-1994	IT 1257184 B	10-01-1996
		AU 690093 B	23-04-1998
		AU 5833594 A	19-07-1994
		CA 2151156 A	07-07-1994
		EP 0675956 A	11-10-1995
		FI 953091 A	21-06-1995
		JP 8509359 T	08-10-1996
		NO 952494 A	21-08-1995
		ZA 9309621 A	22-06-1995
US 5298604 A	29-03-1994	KEINE	